

平成 30 年 6 月 20 日現在

機関番号：16101

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2016～2017

課題番号：16K19556

研究課題名(和文) 正常な皮膚機能に関わるビタミンD受容体の標的遺伝子探索とその発現機序の解明

研究課題名(英文) Role of vitamin D receptor target genes in the epidermal function and hair follicle homeostasis.

研究代表者

沢津橋 俊 (SAWATSUBASHI, Shun)

徳島大学・先端酵素学研究所(オープンイノベ)・特任講師

研究者番号：70535103

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：皮膚におけるビタミンD受容体(VDR)の生体内高次機能は未だ不明な点が多い。本研究で作出した表皮特異的VDR KOマウスは肥厚と脱毛を呈する。その原因を明らかにするために、発現変動する遺伝子を網羅的に探索したところ、S100A8遺伝子の顕著な発現亢進が見出された。さらに、S100A8遺伝子プロモーターは炎症関連転写因子NF-κBによって発現誘導されることを明らかとし、ゲノム編集によってS100A8 floxマウスを作成し、全身性と表皮特異的なS100A8 KOマウスの樹立に成功した。このマウスの解析から、S100A8がVDR KOマウスの表皮肥厚に関与する可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：The in vivo function of vitamin D receptor (VDR) in skin is still unknown. To elucidate VDR function in epidermal development and homeostasis, we generated epidermis-specific VDR KO mice (VDR epiKO). The VDR epiKO mice shows epidermal thickness and hair loss phenotypes. As a result of microarray analysis, it was revealed that S100A8 gene expression was upregulated in VDR epiKO mice. In particular, S100A8 gene promoter was induced by inflammation-related transcription factor NF-κB p65 in cultured human keratinocytes. In contrast, VDR was repressed the NF-κB-mediated S100A8 promoter activation. Furthermore, we established the systemic and epidermis-specific S100A8 KO mice. Analyses of these mouse lines suggests that S100A8 might be involved in epidermal defects of VDR epiKO mice.

研究分野：内分泌学

キーワード：ビタミンD ビタミンD受容体 皮膚 毛包 核内受容体 S100A8

1. 研究開始当初の背景

皮膚は生体を保護する重要な臓器であり、外界からの微生物の侵入に対し抗菌ペプチドの産生など免疫系と連動した防御機能を備える。加えて、皮膚はビタミンDを生合成する唯一の臓器である。産生されたビタミンDは体内循環に入り体中に運搬され、主にビタミンD受容体 (Vitamin D receptor, VDR) を介しその生理作用を発揮する。ビタミンDによる骨や腸管でのカルシウム調節機能の理解とは対照に、皮膚での作用機序については *in vitro* におけるケラチノサイトの分化促進作用について一部理解されているものの、生体内における機序については驚くほど不明なままである。そして疾患の観点からは、くる病/骨軟化症のうちビタミンD依存症II型ではVDRの不活性型変異を有し、骨病変に加え進行性の脱毛を伴うことが報告されている。また炎症を伴う皮膚疾患の乾癬においては、基本治療として活性型ビタミンD外用薬が広く用いられるが、その症状は生涯にわたり再発するため患者のQOL (Quality of life) にとって深刻な問題であり続けている。そのため、産生臓器かつ標的臓器である皮膚表皮においてビタミンDを受容し転写因子として働くVDRの表皮特異的な遺伝子発現制御機構を明らかにすることは喫緊の課題である。

2. 研究の目的

ビタミンDは乾癬治療薬として用いられすでに30年ほど経つにもかかわらず、皮膚表皮細胞におけるその作用機序は未だ判然とせず、再発の問題も残されている。本研究では表皮特異的なビタミンD受容体(VDR)ノックアウトマウスを作出し、その乾癬様の皮疹と脱毛の原因を遺伝子の発現制御レベルで明らかにする。加えて、その責任因子の同定とVDRによる抑制機序の解明を目指す。特に、内因性の炎症様シグナルの活性化がこの一因であると考え、その責任因子の同定とVDRによる抑制機序の解明を目指す。本研究で得られる知見は、本邦における約43万人の乾癬患者に向けて、より優れた治療法の開発に繋がる可能性がある。

3. 研究の方法

(1) 表皮特異的VDR KOマウスで発現変動する遺伝子のうち表皮の肥厚化・毛周期の停止に関与する責任因子の同定を試みる。
 (2) VDRがそれらの遺伝子発現を制御するメカニズムについて検討する。研究方法の概略は以下の通りである。

(1)- 表皮細胞・毛包細胞それぞれの分化マーカーを用いて、炎症関連分子S100A8、S100A9、Cxcl9等を中心に発現領域を探索し、KOマウスでこれらの遺伝子を高発現する細胞種を明らかにする。
 (1)- これら炎症関連分子が皮膚への免疫

細胞の浸潤に寄与するか否かを検討する。また、この状態が乾癬などの炎症性皮膚疾患の前段階または重症化に関与する可能性を考慮し、乾癬誘導モデルでの重症度を比較検討する。

(1)- 子宮内マウス胎仔にこれら炎症関連分子を過剰発現またはノックダウンさせ、肥厚化や脱毛に関与する可能性を検討する。
 (2)- S100A8等のプロモーター解析を行い、これらの遺伝子発現を直接的に制御する上流の転写因子を探索し、皮膚異常を引き起こしているシグナル経路の同定を試みる。
 (2)- (2)-の結果を基に、ビタミンD-VDRが表皮特異的にこれらのプロモーター活性を制御するメカニズムを明らかにする。

4. 研究成果

マイクロアレイ解析で発現増強をみとめたタンパク質を中心に、蛍光免疫組織染色法によりその発現領域から肥厚化との関連性を検討した。これらのうちS100A8は乾癬患者の皮膚で局所的な高発現が報告されており、肥厚化を惹起するシグナル分子としての働きを有する可能性が考えられた。各細胞層のマーカー分子(Keratin14, Keratin10, Filaggrin, Loricrin等)との共染色によりその発現領域を比較し、肥厚化のステージとの関連性を検討したところ、Keratin10の発現する有棘層で顕著な肥厚化が観察された。また驚いたことに、KOマウスではS100A8は退縮期の毛包内で異所性の発現亢進が認められた(図1)。加えて、皮膚組織をFACSで分画することで、この発現亢進は表皮と毛包内基底細胞におけるものである可能性が示された。これまでの報告によると、S100A8が走化性因子である可能性を考慮し、T細胞やマクロファージの浸潤の有無を検討したが、これらには顕著な違いを認めなかった。しかしながら、イミキモド塗布による乾癬モデルでは、その重症化度に若干の差異が認められた。

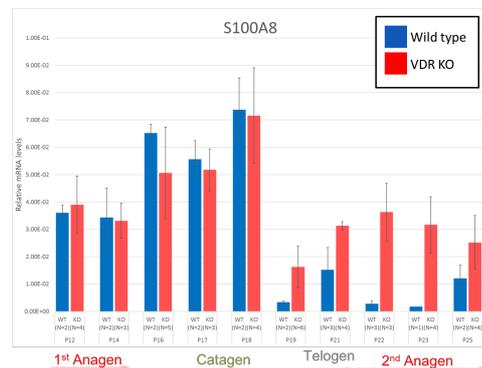


図1. VDRは退縮期(Catagen)以降のS100A8遺伝子の発現抑制に寄与する

そこでこのS100A8遺伝子に着目し、その発現制御および機能について明らかにすることを試みた。表皮VDRの欠損により、

発現亢進される S100A8 遺伝子などの予測プロモーター領域をクローニングし、レポーター解析によりその活性化転写因子を探索した。その結果、特に NF-kB, AP-1 による活性化が顕著であり、中でも S100A8 遺伝子プロモーターに新規の NF-kB 応答領域として 151bp のエンハンサー領域の同定に成功した。

そこで、マウスおよびヒト S100A8 遺伝子のプロモーター解析を行ったところ、複数の炎症関連転写因子、特に NF-kB のうち RelA によって発現誘導されることを見出し、その結合 DNA 配列を同定し、VDR によるプロモーター活性の抑制も認められた (図 2)。一方でレンチウイルスを用いた in vivo ノックダウンを試みたが十分な効率を得られなかったため、ゲノム編集による S100A8 flox マウスの作出を試み、全身性の S100A8 KO マウスと表皮特異的な S100A8 KO マウスの樹立に成功した。また上記の S100A8 プロモーターと EGFP を用いたレポーターマウスの樹立にも成功した。今後は、これら新規に樹立したマウスを VDR KO マウスのバックグラウンドとすることで、S100A8 の発現亢進が表現型に及ぼす影響を明らかにすることができる。

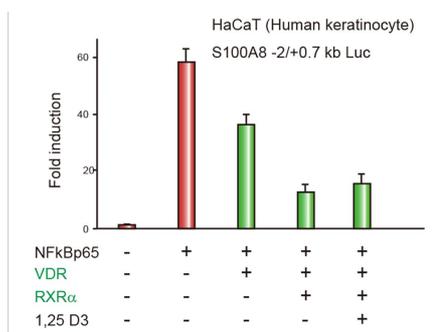


図2. VDR/RXRαはS100A8プロモーターの活性化を抑制する

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

〔雑誌論文〕(計 3件)

Sawatsubashi Shun、Joko Yudai、Fukumoto Seiji、Matsumoto Toshio、Sugano Shigeo S.

Development of versatile non-homologous end joining-based knock-in module for genome editing, Scientific Reports, 査読有、8巻、2018、593

DOI: 10.1038/s41598-017-18911-9

Sawatsubashi Shun

Update on recent progress in vitamin D research. Vitamin D in the treatment of psoriasis, Clinical Calcium, 査読無、27巻、2017、1629-1635

DOI:CliCa171116291635

Sawatsubashi Shun

Hair follicle stem cells, Clinical Calcium, 査読無、27巻、2017、803-808

DOI: CliCa1706803808

〔学会発表〕(計 3件)

沢津橋 俊、上甲 裕大、福本 誠二、松本 俊夫

ビタミン D 受容体による毛周期制御機構の解明

第 91 回日本内分泌学会学術総会、2018 年

Shigeo S. Sugano, Shun Sawatsubashi

Development of versatile modules for NHEJ-based knock-in and optimization of the ratio of donor and cleavage vectors

Cold Spring Harbor Laboratory meeting, CRISPR: the revolution 2017(国際学会)、2017 年

沢津橋 俊、上甲 裕大、山本 陽子、福本 誠二、松本 俊夫

表皮特異的ビタミン D 受容体ノックアウトマウスから理解する正常な表皮・毛包維持機構の解明

2017 年度生命科学系学会合同年次大会分子生物学会 (ConBio2017)(招待講演)、2017 年

〔図書〕(計 0件)

無

〔産業財産権〕

○出願状況 (計 1件)

名称: ゲノム編集方法

発明者: 沢津橋俊、菅野茂夫

権利者: 国立大学法人徳島大学

種類: 特許

番号: 特願 2017-027384

出願年月日: 2017 年 2 月 16 日

国内外の別: 国内

○取得状況 (計 0件)

無

〔その他〕

ホームページ等

・研究室ホームページ

http://www.fujii.tokushima-u.ac.jp/nuclear_receptor/

・ゲノム編集法 VIKING のホームページ

<https://sites.google.com/site/vikingknockin/home>

・VIKING 用 DNA の配布 (addgene)
<https://www.addgene.org/search/advanced/?q=viking>

6 . 研究組織

(1)研究代表者

沢津橋 俊 (SAWATSUBASHI, Shun)
徳島大学・先端酵素学研究所・特任講師
研究者番号 : 70535103

(2)研究分担者

無

(3)連携研究者

無

(4)研究協力者

無